

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
31 mai 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/38393 A1**

(51) Classification internationale des brevets:  
**C07K 14/705**, C12N 15/10, 15/12, 15/63, G01N 33/53,  
A61K 38/17, A61P 33/14, 35/00, 3/14

(74) Mandataires: **DEMACHY, Charles** etc.; Gros-  
set-Fournier & Demachy SARL, 20, rue de Maubeuge,  
F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/03248

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international:  
22 novembre 2000 (22.11.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Données relatives à la priorité:  
99/14633 22 novembre 1999 (22.11.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
Cedex 16 (FR).

**Publiée:**

-- Avec rapport de recherche internationale.  
--- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
requises

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **MORAS,**  
Dino [FR/FR]; 38, rue de Pfulgiesheim, F-67450 Lam-  
pertheim (FR). **GUIBERTEAU, Natacha** [FR/FR]; 10,  
rue Ungemach, F-67300 Schiltigheim (FR). **WURTZ,**  
**Jean-Marie** [FR/FR]; 1, place de l'Eglise, F-67410  
Drusenheim (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: POLYPEPTIDES DERIVED FROM VITAMIN D NUCLEAR RECEPTOR, AND THEIR USES IN PARTICULAR FOR SCREENING VITAMIN D ANALOGUES

(54) Titre: POLYPEPTIDES DERIVES DU RECEPTEUR NUCLEAIRE DE LA VITAMINE D, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS LE CADRE DU CRIBLAGE D'ANALOGUES DE LA VITAMINE D

(57) Abstract: The invention concerns polypeptides derived from vitamin D nuclear receptor, said nuclear receptor comprising a ligand-binding domain, or LBD, said LBD containing a flexible insertion domain. Said polypeptides are characterised in that the LBD flexible insertion domain is modified by substituting or suppressing at least 30 acids. The invention also concerns the use of said polypeptides in particular for screening synthetic vitamin D analogues or for producing tests (double or triple hybrid) for identifying other proteins (activator, repressor,...) interacting with the vitamin D receptor using constructs containing the polypeptide fused with Gal4 for example, or for analysing three-dimensional structures of complexes formed between said polypeptides and a particular molecule by crystallography or NMR.

(57) Abrégé: L'invention a pour objet des polypeptides dérivés du récepteur nucléaire de la vitamine D, ledit récepteur nucléaire comprenant un domaine de liaison au ligand, ou LBD, ce LBD contenant un domaine d'insertion flexible, lesdits polypeptides dérivés étant caractérisés en ce que le domaine d'insertion flexible du LBD est modifié par substitution ou suppression d'au moins environ 30 acides, ainsi que l'utilisation de ces polypeptides notamment dans le cadre du criblage d'analogues synthétiques de la vitamine D, ou dans la mise au point de tests (double ou triple hybride) pour l'identification d'autres protéines (activateur, répresseur,...) interagissant avec le récepteur de la vitamine D par l'utilisation de constructions contenant le polypeptide en fusion avec Gal4 par exemple, ou dans le cadre de l'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes formés entre ces polypeptides et une molécule particulière par cristallographie ou RMN.

WO 01/38393 A1

21-11-00

## POLYPEPTIDES DERIVES DU RECEPTEUR NUCLEAIRE DE LA VITAMINE D, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS LE CADRE DU CRIBLAGE D'ANALOGUES DE LA VITAMINE D

---

5

L'invention a pour objet des polypeptides dérivés du récepteur nucléaire de la vitamine D, les séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides, ainsi que l'utilisation de ces polypeptides notamment dans le cadre du criblage d'analogues synthétiques de la vitamine D, ou dans la mise au point de tests (par exemple double ou

10 triple hybride,...) pour l'identification d'autres protéines (activateur, répresseur, ...) interagissant avec le récepteur de la vitamine D par l'utilisation de constructions contenant le polypeptide en fusion avec Gal4 par exemple, ou dans le cadre de l'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes formés entre ces polypeptides et une molécule particulière par des techniques de cristallographie ou RMN.

15

Le récepteur de la vitamine D (VDR) est un régulateur transcriptionnel dépendant du ligand, appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (NRs) (Mangelsdorf et al., 1995).

20

Les membres de cette famille possèdent la même structure modulaire avec un domaine de liaison à l'ADN (DBD) hautement conservé et un domaine de liaison au ligand (LBD) davantage variable (Mangelsdorf et al., 1995 ; Wurtz et al., 1996).

25

Le VDR se lie à l'élément de réponse correspondant, de type DR3, dans la région promotrice des gènes cibles, sous forme d'hétérodimère avec le récepteur X de l'acide rétinoïque (RXR), ce qui conduit à l'activation ou à la répression de la transcription par l'intermédiaire d'une interaction avec les cofacteurs transcriptionnels et la machinerie transcriptionnelle basale (Deluca & Zierold, 1998).

30

Les métabolites de la vitamine D sont utilisés, ou sont susceptibles d'être utilisés, dans des traitements variés dans le cadre de l'ostéodystrophie, l'ostéoporose, le psoriasis, le cancer et les maladies auto-immunes (Bouillon et al., 1995).

L'hypercalcémie induite par la vitamine D (ou  $1\alpha, 25$  - dihydroxyvitamine  $D_3$ , ou  $1,25(OH)_2 D_3$ ) limite l'utilisation du ligand naturel dans ces applications cliniques, ce qui a conduit au développement d'analogues susceptibles de posséder des effets secondaires réduits.

La séquence du LBD de hVDR est faiblement conservée en comparaison avec les séquences du récepteur de l'acide rétinoïque  $\gamma$  humain (hRAR  $\gamma$ ) et du récepteur X de

l'acide rétinoïque  $\alpha$  humain (hRXR $\alpha$ ) (respectivement 25 % et 17 % d'identité avec le hVDR).

La présence d'un domaine d'insertion dans le LBD des VDR connectant les hélices H1 et H3, représente une caractéristique typique des VDR. La taille de cette  
5 région de connexion varie entre 72 à 81 résidus dans la famille des VDR, tandis qu'elle varie entre 15 à 25 résidus chez les autres récepteurs nucléaires.

Il convient de souligner que dans ce qui suit la numérotation des acides aminés utilisée pour les séquences peptidiques des différents VDR, correspond à la numérotation des acides aminés du VDR humain. L'extension de cette numérotation aux  
10 autres séquences que celle du VDR humain peut se faire sans ambiguïté à partir de l'alignement donné sur la figure 1a ci-après.

Le taux de conservation de séquence de ce domaine d'insertion est très faible (9 % d'identité entre les acides aminés 157-215 du hVDR). Cette région est accessible aux protéases, et contient un site de phosphorylation au niveau de la sérine en position 208,  
15 pour lequel aucun rôle fonctionnel n'a pu être défini.

La présence de ce domaine pourrait expliquer les difficultés rencontrées jusqu'à présent pour cristalliser les LBD des VDR. En effet, ce domaine est faiblement structuré comme le montre les analyses de structure secondaire qui ne prédisent que quelques brins courts avec des statistiques assez faibles, et contient un pourcentage très élevé de  
20 résidus chargés négativement. Ces deux facteurs pourraient augmenter le nombre de conformères de cette boucle, affectant ainsi la stabilité de la protéine, et favorisant les contacts non spécifiques qui interfèrent avec les processus de cristallisation.

La présente invention a pour but de fournir des polypeptides dérivés des récepteurs nucléaires de la vitamine D sous une forme soluble et pouvant être  
25 cristallisés.

L'invention a également pour but de fournir des séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides dérivés, ainsi que des procédés de préparation desdits polypeptides dérivés par transformation de cellules appropriées avec lesdites séquences nucléotidiques.

L'invention a également pour but de fournir de nouvelles méthodes de criblage de composés analogues de la vitamine D et/ou d'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes formés entre ces polypeptides et une molécule particulière, lesdites  
30 méthodes étant effectuées à l'aide des polypeptides dérivés susmentionnés.

L'invention a également pour but de fournir des kits pour la mise en œuvre des méthodes susmentionnées.

L'invention sera illustrée à l'aide des figures suivantes :

5 - Figure 1 : a) alignement des séquences peptidiques des VDR de différentes espèces (hVDR : VDR d'*homo sapiens* [humain]; bVDR : VDR de *bos taurus* [bovin]; gVDR : VDR de *gallus gallus* [poulet]; rVDR : VDR de *ratus norvegicus* [rat]; mVDR : VDR de *mus musculus* [souris]; cVDR : VDR de *coturnic japonica* [caille japonaise]; xVDR : VDR de *xenopus laevi* [grenouille africaine]) avec les séquences du RXR $\alpha$  humain (hRXR $\alpha$ ) et du RAR $\gamma$  humain (hRAR $\gamma$ ). Les domaines d'insertion  
10 des VDR qui ont été supprimés sont ceux encadrés.

b) conformation générale du domaine de liaison au ligand de hVDR; les hélices sont représentées par des cylindres et les feuillets  $\beta$  par des flèches.

15 - Figure 2 : a) analyse de Scatchard de la liaison de 1,25(OH) $_2$  D $_3$  au LBD du hVDR sauvage (118-427; courbe en pointillé indiquée par des triangles) et au LBD du mutant dérivé du hVDR (118-427  $\Delta$  165-215; courbe pleine indiquée par des losanges) ; la quantité de 1,25(OH) $_2$  D $_3$  marquée liée est indiquée en abscisse en nM, et le rapport B/U entre les LBD sauvage ou mutant liés (B) et non liés (U) est indiqué en ordonnée.

20 b) activités CAT du hVDR sauvage et du hVDR mutant; ces activités sont indiquées en ordonnée en pourcentage; la colonne 1 correspond à l'activité CAT mesurée en absence de vitamine D (VD), de hVDR sauvage (sauvage) et de hVDR mutant (tronqué); la colonne 2 correspond à l'activité CAT mesurée en présence de VD, et en l'absence de hVDR sauvage et de hVDR mutant; la colonne 3 correspond à l'activité CAT mesurée en présence de hVDR sauvage, et en l'absence de VD et de hVDR mutant; la colonne 4 correspond à l'activité CAT mesurée en présence de VD et de hVDR sauvage, et en l'absence de hVDR mutant; la colonne 5 correspond à l'activité CAT mesurée en présence de hVDR mutant, et en l'absence de VD et de hVDR sauvage; la colonne 6 correspond à l'activité CAT mesurée en présence de hVDR mutant et de VD, et en l'absence de hVDR sauvage.

30 - Figure 3 : a) représentation de la région du feuillet  $\beta$  de RAR $\gamma$ ,  
b) représentation de la région du feuillet  $\beta$  du VDR dans la même orientation que celle de RAR $\gamma$  ci-dessus,

c) représentation des interactions intramoléculaires de l'hélice H12 dans le VDR,

d) interface entre le LBD du VDR et l'hélice H3n d'une molécule symétriquement reliée.

5           - Figure 4 :     a) schéma de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ,  
                              b) représentation schématique de la poche de liaison au ligand du hVDR,

                              c) vitamine D dans sa densité électronique contournée à  $1\sigma$ ,  
                              d) cavité du ligand.

10           - Figure 5 : séquence nucléotidique codant pour le hVDR sauvage (SEQ ID NO : 1), et séquence peptidique du hVDR sauvage (SEQ ID NO : 2),

                  - Figure 6 : séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 3) codant pour le polypeptide mutant dérivé du hVDR (1-427  $\Delta$  165-215), et séquence peptidique dudit polypeptide (SEQ ID NO : 4),

15           - Figure 7 : séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 5) codant pour le polypeptide mutant dérivé du hVDR (118-427  $\Delta$  165-215), et séquence peptidique dudit polypeptide (SEQ ID NO : 6),

                  - Figure 8 : séquence nucléotidique (SEQ ID NO : 7) codant pour le polypeptide mutant dérivé du hVDR (124-427  $\Delta$  165-215), et séquence peptidique dudit polypeptide (SEQ ID NO : 8)

20           La présente invention a pour objet les polypeptides dérivés du récepteur nucléaire de la vitamine D chez l'homme ou les différentes espèces du règne animal possédant un tel récepteur, ledit récepteur nucléaire comprenant un domaine de liaison au ligand, ou LBD, ce LBD contenant un domaine d'insertion flexible, lesdits polypeptides dérivés étant caractérisés en ce qu'ils comprennent :

25           - les séquences peptidiques desdits récepteurs nucléaires dans lesquelles :

                  \* le domaine d'insertion flexible du LBD est modifié par substitution ou suppression d'au moins environ 30 acides aminés, et de préférence d'au moins environ 40 acides aminés, ou de la totalité des acides aminés composant ce domaine  
30           d'insertion (à savoir environ  $50 \pm 10$  acides aminés),

\* et, le cas échéant, un ou plusieurs ou la totalité des acides aminés situés aux positions 1 à environ 125, notamment aux positions 1 à 117 ou 123, des séquences peptidiques desdits VDR, sont modifiés par substitution ou suppression,

lesdits polypeptides dérivés possédant les caractéristiques suivantes :

5           \* les propriétés de liaison au ligand et de transactivation du LBD du récepteur de la vitamine D sont conservées,

          \* ils sont stables, à savoir qu'ils peuvent être conservés, notamment dans NaCl 100 mM à pH 7 pendant au moins environ une semaine, sans que soit pour autant affectées les propriétés susmentionnées du LBD, par opposition au LBD non  
10           modifié qui est instable dans les conditions susmentionnées,

          \* ils sont cristallisables dans des solvants aqueux, notamment à 4°C par la méthode de diffusion de vapeur à goutte suspendue,

          \* et, ils sont solubles dans des solvants aqueux,

          - ou les séquences peptidiques dérivées des séquences peptidiques définies ci-dessus, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, lesdites séquences dérivées possédant les caractéristiques mentionnées ci-dessus desdits polypeptides dérivés.  
15

L'invention a plus particulièrement pour objet les polypeptides dérivés des VDR d'origine humaine ou animale tels que définis ci-dessus, lesdits polypeptides dérivés  
20           étant caractérisés en ce qu'ils comprennent les séquences peptidiques desdits récepteurs nucléaires dans lesquelles est supprimé le fragment peptidique délimité :

          - d'une part, par un acide aminé situé approximativement à l'une des positions 155 à 175 des séquences peptidiques des récepteurs nucléaires de la vitamine D d'origine humaine ou animale, notamment des séquences peptidiques des VDR  
25           représentées sur la figure 1a, et plus particulièrement par l'acide aminé situé à l'une des positions 159 à 168 de ces séquences,

          - et, d'autre part, par un acide aminé situé approximativement à l'une des positions 204 à 225 des séquences peptidiques des récepteurs nucléaires de la vitamine D d'origine humaine ou animale, notamment des séquences peptidiques des VDR  
30           représentées sur la figure 1a.

L'invention concerne plus particulièrement les polypeptides dérivés tels que définis ci-dessus, lesdits polypeptides dérivés étant choisis parmi ceux comprenant :

- la séquence en acides aminés délimitée par les acides aminés situés aux positions 118 et 427, ou aux positions 124 et 427 des séquences peptidiques des VDR d'origine humaine ou animale, notamment des séquences peptidiques des VDR représentées sur la figure 1a, et dans laquelle les résidus situés aux positions 165 à 215 desdites séquences peptidiques des VDR sont supprimés,

- ou une séquence peptidique dérivée de la séquence en acides aminés susmentionnée, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée possédant les caractéristiques mentionnées ci-dessus dudit polypeptide dérivé.

L'invention concerne plus particulièrement les polypeptides dérivés tels que définis ci-dessus choisis parmi les suivants :

- le polypeptide SEQ ID NO : 4 dérivé du VDR d'origine humaine dans lequel le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 165 et 215 est supprimé,

- le polypeptide SEQ ID NO : 6 [encore désigné hVDR (118-427  $\Delta$  165-215)] dérivé du VDR d'origine humaine dans lequel le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 1 et 117, et le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 165 et 215 sont supprimés,

- le polypeptide SEQ ID NO : 8 [encore désigné hVDR (124-427  $\Delta$  165-215)] dérivé du VDR d'origine humaine dans lequel le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 1 et 123, et le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 165 et 215 sont supprimés.

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques codant pour un polypeptide dérivé tel que défini ci-dessus.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les séquences nucléotidiques choisies parmi :

- les séquences SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 7, représentées respectivement sur les figures 6, 7, et 8,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique des séquences nucléotidiques susmentionnées, et codant pour un polypeptide dérivé du hVDR tel que défini ci-dessus,

- ou une séquence nucléotidique dérivée des séquences nucléotidiques susmentionnées, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant pour une séquence peptidique dérivée des polypeptides dérivés du hVDR définis ci-dessus, et possédant les caractéristiques mentionnées ci-dessus desdits polypeptides dérivés.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques recombinantes comprenant une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus en association avec les éléments nécessaires à la transcription de cette dernière séquence, notamment avec un promoteur et un terminateur de transcription.

L'invention concerne également les vecteurs, notamment plasmides ou virus tels que les baculovirus, contenant une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus.

L'invention a également pour objet les cellules hôtes transformées par un vecteur susmentionné, lesdites cellules étant choisies notamment parmi les bactéries telles que *E. coli*, ou les cellules d'insectes susceptibles d'être infectées par un baculovirus.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un polypeptide dérivé tel que défini ci-dessus, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- transformation de cellules à l'aide d'un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus,
- mise en culture des cellules ainsi transformées, et récupération dudit polypeptide produit par lesdites cellules, le cas échéant après purification.

L'invention concerne également les polypeptides dérivés du récepteur nucléaire de la vitamine D tels que définis ci-dessus, liés à la vitamine D ou à un analogue de la vitamine D, notamment à tout ligand capable de se lier auxdits polypeptides avec une haute affinité, à savoir une affinité supérieure à environ  $10^{-6}$  M.

L'invention concerne également les polypeptides dérivés du récepteur nucléaire de la vitamine D tels que définis ci-dessus, le cas échéant liés à la vitamine D ou à un analogue de la vitamine D, et se présentant sous forme de cristaux.

Avantageusement, les cristaux susmentionnés de la présente invention sont obtenus par diffusion de vapeur en présence notamment de sulfate d'ammonium en tant que précipitant, ou d'un autre agent précipitant.



Avantageusement encore, les cristaux de l'invention sont utilisables dans le cadre de techniques de cristallographie aux rayons X.

Les cristaux susmentionnés peuvent atteindre une résolution déterminée par cristallographie aux rayons X inférieure à 25 Å, qui fournit une information au niveau atomique de l'interaction entre une molécule cible et le récepteur.

L'invention a plus particulièrement pour objet les cristaux de hVDR (118-427  $\Delta$  165-215) complexé à 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, caractérisés en ce qu'ils appartiennent au groupe d'espace orthorhombique (P2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub>) avec  $a = 45.193 \text{ \AA}$ ,  $b = 52.443 \text{ \AA}$ ,  $c = 133.286 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ .

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de cristaux susmentionnés, pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'analogues synthétiques de la vitamine D.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de cristaux susmentionnés, pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'analogues agonistes ou antagonistes de la vitamine D susceptibles d'être utilisés dans des compositions pharmaceutiques, notamment dans le cadre du traitement de pathologies cancéreuses, de l'ostéodystrophie, de l'ostéoporose, du psoriasis, des maladies auto-immunes.

L'invention concerne également des procédés de criblage d'analogues de la vitamine D, ou de cofacteurs, comprenant les étapes suivantes :

- mise en présence d'un polypeptide dérivé tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de cristaux susmentionnés, avantageusement lié à un support solide, avec l'analogue ou cofacteur testé, l'un dudit polypeptide dérivé ou de l'analogue de la vitamine D étant avantageusement marqué, notamment à l'aide d'un marqueur fluorescent, radioactif ou enzymatique,

- détection de l'éventuelle liaison entre ledit polypeptide dérivé et l'analogue testé par mesure du marqueur utilisé, notamment après rinçage du support utilisé lors de l'étape précédente.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide dérivé tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de cristaux susmentionnés, pour la mise en

œuvre d'une méthode d'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes formés entre ledit polypeptide et une molécule déterminée.

A ce titre l'invention concerne plus particulièrement une méthode d'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes formés entre un polypeptide dérivé tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de cristaux susmentionnés, et une

5 molécule déterminée, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- mise en présence d'un polypeptide dérivé tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de cristaux susmentionnés, avec la molécule déterminée,

- cristallisation du complexe formé entre ledit polypeptide dérivé et la molécule déterminée, notamment par diffusion de vapeur, et analyse tridimensionnelle dudit complexe notamment par remplacement moléculaire,

10

- ou analyse tridimensionnelle dudit complexe en solution, notamment par RMN.

L'invention concerne également l'application de la méthode d'analyse susmentionnée à la conception de composés susceptibles d'être des agonistes ou des antagonistes de la vitamine D tels que définis ci-dessus.

15

L'invention a plus particulièrement pour objet les analogues agonistes ou antagonistes de la vitamine D tels qu'obtenus par mise en œuvre d'un procédé de criblage susmentionné, ainsi que les compositions pharmaceutiques comprenant ces analogues en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20

L'invention a également pour objet les kits (ou trousse) pour la mise en œuvre d'un procédé de criblage ou d'une méthode d'analyse susmentionnés, lesdits kits comprenant un polypeptide dérivé tel que défini ci-dessus, le cas échéant sous forme de cristaux susmentionnés, en association avec un ou plusieurs réactifs pour la mise en œuvre du procédé ou de la méthode susmentionnée.

25

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la préparation du polypeptide dérivé hVDR (118-427  $\Delta$  165-215), et de l'analyse de la structure cristalline et des propriétés du polypeptide dérivé ainsi obtenu.

Le polypeptide dérivé représenté sur la figure 7 (encore désigné mutant LBD VDR (résidus 118-427  $\Delta$  165-215)), a été préparé sans son domaine d'insertion flexible en supprimant les résidus 165 à 215 de hVDR (Figure 1a) et en laissant une trentaine de résidus afin de connecter les hélices H1 et H3.

30

Le mutant LBD VDR (résidus 118-427  $\Delta$  165-215) a été surexprimé dans *E. coli* et purifié par chromatographie d'affinité et d'échange d'ions, et par filtration sur gel, selon la méthode décrite ci-après.

5 A) Expression et purification du mutant LBD VDR 118-427  $\Delta$  165-215

Le récepteur VDR muté (résidus 118-427  $\Delta$  165-215) a été surproduit sous forme de peptide avec un tag hexahistidine. Le cDNA amplifié par PCR a été sous-cloné dans les sites NdeI-BamHI du vecteur pET15b (Novagen). Le plasmide a été ensuite amplifié dans les bactéries *E. coli* XL-1 Blue afin de contrôler la séquence et a été introduit dans les bactéries *E. coli* BL21DE3 pour la surexpression. Une préculture de 200 ml de LB avec 200  $\mu$ g ampicilline/ml est utilisée pour inoculer 6x 1l de LB contenant 200  $\mu$ g ampicilline/ml. Les cellules sont cultivées à 37°C jusqu'à une absorbance de 0.6 puis l'expression de la protéine est induite par l'addition de 1 mM d'IPTG dans le milieu de culture durant 6h à 20°C. Les cellules sont culottées par ultracentrifugation et conservées à -80°C.

Le culot cellulaire représentant 1 l de culture est repris dans 25 ml de tampon contenant 20mM Tris pH8.0, 250 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 5% glycérol, 0.5  $\mu$ g/ml du cocktail d'inhibiteur de protéases, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 1 mM de PMSF. La lyse des cellules s'effectue par sonication et l'extrait brut est obtenu par ultracentrifugation à 45 K pendant 1h30. La purification s'effectue en trois étapes. L'extrait brut est dans premier temps chargé sur une colonne d'affinité métallique (Talon, Clontech). Après lavage, la protéine est éluée avec un tampon contenant 20 mM Tris pH8.0, 250 mM NaCl, 150 mM Imidazole et 5% glycérol. La protéine est ensuite concentrée sur Centriprep 30 et diluée avec 4 volumes de tampon 20 mM Tris pH7.5, NaCl 50mM et DTT 5 mM. L'échantillon est ensuite chargé sur une colonne d'échange anionique Q15 (Sartorius) et élué par un gradient de NaCl (0 $\rightarrow$ 1M). Afin de couper le tag hexahistidine, la protéine est digérée par la thrombine (1 unité par mg de protéine) à 4°C pendant 12h en présence de CaCl<sub>2</sub> 5mM. Finalement la protéine est chargée sur gel de filtration Superdex 75 16/60 (Pharmacia) équilibrée avec 10 mM Tris pH7.0, 100 mM NaCl, 10 mM DTT et éluée avec ce même tampon. Le ligand est alors ajouté en excès et incubé avec la protéine à 4°C durant 12h. Le complexe est alors concentré sur Centricon 30 pour la cristallisation.

La quantité de protéine purifiée est de 2 mg/l de culture. La qualité et l'homogénéité de la protéine sont analysées par électrophorèse en condition dénaturante et native. La protéine est pure à plus de 95% et une bande unique est observée sur gel natif. La protéine est monomérique selon l'élution de la filtration sur gel et des mesures de diffusion de lumière. La concentration en protéine est mesurée par Bradford et par spectrophotométrie. L'échantillon est monodisperse selon les mesures de diffusion de lumière.

B) Analyse et propriétés du VDR 118-427  $\Delta$  165-215.

La capacité de la protéine mutante à se lier à  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a été déterminée par la méthode de Scatchard en utilisant des extraits bruts de la protéine recombinante (Figure 2a : les analyses de Scatchard ont été effectuées sur Dextran/charbon; les extraits bruts de *E. coli* BL21 (DE3) exprimant hVDR sauvage ou mutant / pET 15b, ont été dilués 1000 fois et incubés avec des quantités croissantes ( $^3\text{H}$ -26,27, Amersham)  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dans Tris 20 mM, NaCl 250 mM, dithiothréitol (DTT) 5 mM, glycérol 10% pendant 16 heures à 4°C; après incubation, 25  $\mu\text{l}$  de Dextran/charbon (1,5%) ont été additionnés à 25  $\mu\text{l}$  du mélange de protéines; après 5 min les tubes ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min; les concentrations de ligand lié (B) ont été déterminées par comptage en scintillation liquide sur le surnageant; les concentrations en ligand total ont été mesurées par comptage en scintillation liquide sur 15  $\mu\text{l}$  du mélange de protéines avant addition de Dextran/charbon; U représente le ligand non lié; chaque point représente la moyenne de trois valeurs; les résultats ont été analysés par la méthode non linéaire de moindre carré selon la méthode décrite par Claire et al., 1978; la courbe pleine et celle en pointillé correspondent respectivement aux résultats expérimentaux obtenus avec le polypeptide mutant dérivé et la protéine sauvage, avec les paramètres  $N = 0,073 \pm 0,006$  nM,  $K_d = 0,37 \pm 0,05$  nM,  $\beta = 0,058 \pm 0,002$  pour le polypeptide mutant dérivé, et  $N = 0,10 \pm 0,01$  nM,  $K_d = 0,55 \pm 0,08$  nM,  $\beta = 0,051 \pm 0,003$  pour la protéine sauvage, avec  $N$  = nombre de sites,  $K_d$  = constante de dissociation, et  $\beta$  = liaison non spécifique; les expériences ont été répétées deux fois).

Aucun changement significatif entre les constantes de dissociation des VDR du type sauvage et mutant n'a été observé, les valeurs étant similaires à celle décrites préalablement pour le récepteur entier (Bouillon et al., 1995). Afin de comparer les

propriétés de transactivation des deux protéines, les LBD sauvages et mutants ont été fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de l'activateur GAL4 de la levure. Les protéines chimériques ont été exprimées par transfection dans les cellules Cos, et la transactivation a été mesurée avec un rapporteur approprié répondant à GAL4. Les deux

5 protéines présentent des propriétés de transactivation comparables dans ce système (Figure 2b : les LBD de VDR sauvage ou mutant ont été fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de l'activateur Gal4 (1-147) de la levure par clonage de l'ADNc dans les sites XhoI-BamHI du vecteur PXJ440 (Xiao et al., 1991); les cellules Cos ont été transfectées selon la méthode décrite par Xiao et al., 1991, avec les vecteurs (250 ng)

10 contenant les LBD sauvage ou mutant de hVDR avec 2 µg de gène rapporteur 17m5-TATA-CAT et 2 µg d'un recombinant de contrôle interne pCH110lacZ (Pharmacia) exprimant la β-galactosidase complété à 20 µg avec un ADN support; les cellules ont été traitées avec EtOH ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 10<sup>-7</sup>M; les activités CAT, normalisées en unités égales de β-galactosidase, sont exprimées par rapport à l'activité CAT (100%) induite

15 par le VDR sauvage en présence de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

Par conséquent, la délétion du domaine d'insertion n'a pas d'effet majeur sur la liaison du ligand, la transactivation ou la dimérisation avec le LBD de RXRα.

La suppression du domaine d'insertion flexible dans le LBD de VDR a conduit à une protéine davantage soluble, qui peut être cristallisée sous forme de complexe avec

20 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Des cristaux ont pu être obtenus par des techniques de diffusion de vapeur en utilisant du sulfate d'ammonium en tant que précipitant. La structure du cristal a été résolue par une combinaison de remplacement moléculaire, en utilisant un modèle partiel de RARγ (Renaud et al. 1995 ; Klaholz et al., 1998), et de remplacement isomorphe avec un dérivé du mercure. Les résultats obtenus sont résumés sur le tableau

25 I ci-après.

Tableau 1

	Composé naturel	Dérivé thiomersal
5		
<b>groupe de données</b>		
	Hambourg BW7B	Laboratoire
	0,8345 Å	1,5418 Å
10	20,0-1,8 Å	20,0-2,9 Å
	29434	6404
	97,4%	84,9%
	4,1	2,8
	6,1%	9,8%
15	24%, 5,06, 93,3%	20,6%, 3,2, 71,4%
		4
		1,33 / 1,72
		53 %
20	<b>Affinement</b>	
	facteur R libre (10% des réflexions) <sup>b</sup>	21,4%
	facteur R	19,1%
	nombre d'atomes non hydrogène	
	protéine	1994
25	ligand	30
	molécules d'eau	166
	Rmsd sur la longueur de liaison (Å)	0,004
	Rmsd sur les angles de liaison (Å)	1,083
	moyenne des facteurs B pour les atomes non hydrogène (Å <sup>2</sup> )	
30	protéine	31,0
	ligand	22,3
	eau	45,6

(Tableau 1 : les expériences de cristallisation ont été effectuées à 4°C par la méthode de diffusion de vapeur à goutte suspendue; la protéine a été concentrée de 4 à 10 mg/ml; les cristaux de hVDR (118-427  $\Delta$  165-215) complexés à 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ont été obtenus en 4 jours à partir d'une solution contenant du sulfate d'ammonium 0,7 M, tampon Mes 50 mM pH6.0, Tris 5mM, DTT 5mM équilibré contre un réservoir contenant du sulfate d'ammonium 1,4 M, Mes 0,1 M pH = 6.0; les cristaux appartiennent au groupe d'espace orthorhombique (P2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub>) avec a = 45.193 Å, b = 52.443 Å, c = 133.286 Å,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ; l'unité asymétrique contient un monomère; le contenu en solvant des cristaux est de 48 %; le facteur B estimé par la méthode de Wilson est 29. Le dérivé à atome lourd a été obtenu en trempant les cristaux dans du Thiormesal (Ethyl mercurylthiosalicylate) pendant 4 jours; les résultats de diffusion aux rayons X des cristaux naturels ont été mesurés à 4 °C sur la ligne de faisceau BW7B au synchrotron de Hambourg; les résultats ont été traités en utilisant les logiciels DENZO et SCALEPACK (Otwinowski et al., 1997); les phases initiales ont été obtenues par remplacement moléculaire avec AMORE (Navaza et al., 1994), en utilisant le RARy comme modèle de départ; ce modèle contient les hélices conservées H1, H3-H5, H7-H10 (Figure 1a); la solution a une corrélation de 31 % et un facteur R de 53,6 % après remplacement de corps rigide AMORE; complétés par les phases obtenues à l'aide du dérivé mercuriel dont les données de diffraction ont été enregistrées sur un détecteur d'image bidimensionnelle Mar Research au laboratoire à 4° C; les sites dérivés ont été trouvés et affinés avec le logiciel SOLVE (Tervilliger et al., 1987).

La carte obtenue par des phases combinées a été calculée à une résolution de 3 Å en utilisant une correction de solvant. L'affinement a été effectué avec le logiciel CNS (Brünger et al., 1998). Des cycles de construction du modèle avec le logiciel O (Jones et al., 1991) et une minimisation de moindre carré, suivi d'un affinement anisotrope individuel de facteur B ont conduit au modèle final. Tous les résultats entre 20 et 1,8 Å ont été inclus dans l'affinement sans seuils de coupure. Les molécules de solvant de la première couche d'hydratation ont été localisées avec le logiciel CNS sur une carte F<sub>0</sub>-F<sub>c</sub> à 3 sigma. Les valeurs maximales de facteur B (40-50) correspondent aux résidus dans la boucle avant H1, la jonction et les boucles H9-H10 et H11-H12. La qualité du modèle final a été analysée par le logiciel PROCHECK (Laskowski et al., 1993). La distribution d'angle Ramachandran indique 92,4 % de conformations les plus favorables, et 7,6 % de conformations autorisées.

Le modèle final contient 250 résidus, 166 molécules d'eau et une molécule de ligand. Aucune densité claire n'a été observée pour les deux premiers résidus N-terminaux et les quatre derniers résidus C-terminaux. Trois résidus additionnels, 375 à 377 dans la boucle H9-H10, n'ont pas été inclus dans l'affinement en raison de la qualité modérée de la carte de densité électronique dans cette région.

La topologie globale du LBD de VDR (figure 1b) est similaire à celle des autres LBD de récepteurs nucléaires, avec 13 hélices prises en sandwich dans 3 couches et un feuillet  $\beta$  à trois brins. La nomenclature est fondée sur la structure de hRXR $\alpha$  (Bourguet et al., 1995). Le domaine reliant les hélices H1 et H3 contient deux petites hélices H2 et H3n. La nouvelle hélice H3n forme le fond de la structure et remplace la boucle  $\Omega$  dans la structure de RAR $\gamma$ . La flexibilité intrinsèque des trois résidus glycine (162-164) situés à la jonction favorise une adaptation douce.

Ce fragment de trois résidus est plutôt éloigné du ligand, et il est par conséquent peu probable qu'il joue un rôle dans la liaison au ligand. La structure VDR est plus proche de celle du RAR $\gamma$  complexé à des agonistes. Les protéines se superposent avec un rmsd de 1,2 Å sur 179 résidus (seuil de coupure de 2,5 Å sur Ca), les régions exclues étant le peptide connectant H1 à H3, le brin  $\beta$ 2, l'hélice H6 et quelques boucles de connexion.

La différence la plus notable se situe au niveau de la connexion entre les hélices H1 et H3, qui dans le RAR $\gamma$  entoure le feuillet  $\beta$ , et dans le VDR suit un chemin entre H3 et l'extrémité du feuillet  $\beta$ , identique à celui de ER $\alpha$  (Brzozowski et al., 1997). Par conséquent, l'extrémité du feuillet  $\beta$  est déplacée vers l'extérieur et agrandit la cavité de liaison à la vitamine D (Figure 3a et 3b). Tous les brins  $\beta$  ont des résidus en contact avec le ligand. Dans le brin  $\beta$ 1, Trp 286, spécifique des récepteurs VDR, joue un rôle important dans le positionnement du ligand. Il fait partie d'un réseau de liaisons hydrogène impliquant Ser 275 qui est elle-même liée par liaison hydrogène à Gln 317 et au carbonyle de Met 272. L'extrémité du feuillet  $\beta$  est aussi stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les groupes carbonyles de Glu 292 et Lys 294, et Arg 158 de la boucle de connexion entre les hélices H2 et H3n.

L'hélice H12, dont le positionnement est important pour la liaison de coactivation et la transactivation, est en position agoniste (Figure 3c). L'hélice est stabilisée dans cette orientation par des contacts hydrophobes (Ile 268 de H5 et Phe 422 de H12) et interactions polaires. Dans ces dernières interactions sont engagées le pont conservé



Lys 264-Glu420, et une liaison hydrogène entre Ser 235 de H3 et Thr 415. De plus, les groupes carbonyles de Met 412 et de Leu 414 de la boucle H11-H12 sont liés par liaison II à Arg 154 (extrémité de H12) qui fait lui-même des liaisons H avec Asp 232 (H3). Tous ces résidus sont conservés chez les récepteurs VDR. La mutagenèse dirigée des résidus Lys 264 et Glu 420 qui établissent le pont salin, a permis de révéler que ces mutations suppriment la transactivation dépendante du ligand, mais n'a pas d'effet sur la liaison au ligand, l'hétérodimérisation avec RXR ou la liaison à l'ADN (Nakajima et al., 1998).

Un fort contact cristallin est observé entre l'hélice H3n et les hélices H3, H4 et H12 d'une molécule symétriquement reliée (Figure 3d). H3n mime les contacts du peptide SRC1 observés dans le complexe ternaire de PPAR (Nolte et al., 1998), bien qu'il ne contienne pas le motif LXXLL trouvé chez la plupart des coactivateurs. Cette hélice est ancrée par contacts polaires à travers des liaisons H entre la région N-terminale de H3n (Ser 216, Val 217 et Thr 218) et Glu 420 (H12). Au niveau de la région C-terminale de l'hélice H3n, Ser 222 est lié par liaison hydrogène à Lys 246 (extrémité de l'hélice H3). L'importance fonctionnelle de cette lysine a été démontrée par mutation en glycine qui affecte fortement la transactivation (Whitfield et al., 1995). Entre les résidus Lys 246 et Glu 420, une cavité hydrophobe est formée par les hélices H3, H4 et H12. Les résidus de l'hélice H3n (Val 217, Thr 218, Leu 219, Leu 221, et Ser 222) sont en contact par liaison van der Waals avec Ile 242 (H3), Ile 260 (H4), Leu 417 et Val 421 (H12). Cette observation montre que d'autres séquences que LXXLL doivent être prises en considération dans le cadre du processus de reconnaissance des récepteurs nucléaires.

La structure du VDR lié à son ligand naturel a permis de résoudre nombre d'ambiguïtés et de questions concernant la conformation de la vitamine D active. La comparaison avec la structure cristallographique de la molécule libre de vitamine D (Suwinska et al., 1996) montre que les deux ligands ont une conformation identique pour les noyaux A, C et D (Figure 4a). La différence la plus appréciable est la géométrie non planaire du triène conjugué dans le complexe, qui résulte de la forme courbe du ligand nécessaire à sa fixation au récepteur. La poche de liaison au ligand est bordée de résidus hydrophobes prédominant (Figures 4b et 4c). Le ligand étendu englobe l'hélice H3 avec son noyau A (Figures 3b et 3c) orienté vers les extrémités C-terminales de l'hélice H5 et le groupe hydroxyle-25 proche des hélices H7 et H11. Le groupe méthyle 27 forme une faible interaction avec l'hélice H12 (Val 418). Les distances séparant les

parties hydroxyle-25 des groupes hydroxyles du noyau A, 1-OH et 3-OH, sont de 13 Å et de 15,4 Å, respectivement.

Dans le complexe, le noyau A adopte une conformation B en chaise avec les groupes 1-OH et 3-OH respectivement en orientations équatoriales et axiales. La partie hydroxyle en position 1 forme deux liaisons H avec Ser 237 (H3) et Arg 274 tandis que le groupe 3-OH forme deux liaisons H avec Ser 278 (H5) et Tyr 143 qui est conservé uniquement chez les mammifères. Arg 274 est compris dans un réseau serré de liaisons H avec des molécules d'eau et le carbonyle de Thr 142 à l'extrémité de H1 (Figure 4c).

Le triène conjugué (Figure 4a), connectant les noyaux A et C est situé dans un canal hydrophobe pris en sandwich entre Ser 275 (boucle H5-β) et Trp 286 (β1) sur l'un des côtés et Leu 233 (H3) sur l'autre côté. La liaison unique C6-C7 présente une conformation trans qui dévie de 30 % par rapport à la géométrie planaire. Cette déviation explique le manque d'activité biologique des analogues ayant une conformation trans ou cis de la liaison C6-C7 (Norman et al., 1997). De façon exclusive, des résidus hydrophobes entourent cette chaîne. Le groupe 25-hydroxyle est lié par liaison H à His 305 (boucle H6-H7) et His 397 (H11) (Figure 4). Un réseau de liaison H autour des résidus histidine indique que His 305 et His 397 sont respectivement les accepteurs et donneurs de liaison H. Tous les résidus impliqués dans le réseau de liaison H à l'exception de Ser 306 sont conservés parmi les VDRs. Les mutants naturels que l'on trouve dans le rachitisme résistant à la vitamine D, Arg274Leu et His305Gln (Kristjansson et al., 1993), confirme le rôle critique pour la liaison au ligand de Arg 274 et His 305, impliqués respectivement dans l'ancrage de 1-OH et 25-OH.

Conformément au fait que le ligand 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est plus grand que l'estradiol, la progestérone et l'acide rétinoïque tout trans, la poche de liaison au ligand du VDR est plus grande (697 Å<sup>3</sup>) (Figure 4d) que celle du ER (369 Å<sup>3</sup>), du PR (427 Å<sup>3</sup>), du RARγ (421 Å<sup>3</sup>). Toutefois, l'augmentation de taille n'est pas proportionnelle puisque 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> occupe seulement 56 % de la liaison au ligand du VDR, en comparaison aux 63 %, 67 % et 66 % calculés respectivement avec l'estradiol, la progestérone et l'acide rétinoïque tout trans.

Le volume accessible de la cavité des VDR montre une expansion de la poche à proximité de la position 2 du noyau A, qui est occupée par deux molécules d'eau et représente 40 Å<sup>3</sup>. Cet espace additionnel pourrait recevoir le groupe méthyle massif du

ligand synthétique 2 $\alpha$ -méthyl 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> qui en effet présente une affinité de liaison 4 fois plus importante que le ligand naturel (Fujishima et al., 1998). De plus, l'espace additionnel autour de la chaîne aliphatique pourrait permettre le logement de différentes longueurs de chaîne.

5 Plusieurs analogues de la vitamine D ont été montrés comme se comportant différemment du ligand naturel s'agissant de la transactivation et du recrutement de coactivateur (Takeyama et al., 1999 ; Rachez et al., 1998). Afin de comprendre cette spécificité, des études préliminaires du modelage du ligand ont été réalisées. Les ligands synthétiques possédant une chaîne aliphatique plutôt rigide en position 17, tel que MC  
10 903 (22ène-26, 27 -cyclopropyl- 1 $\alpha$ , 24S (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) ou EB 1089 (22,24 diène - 24, 26, 27 tri-homo 1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) (une ou deux double liaisons respectivement), peuvent loger dans la poche de liaison avec seulement quelques ajustements mineurs de la géométrie de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Les noyaux C et D doivent seulement être déplacés afin de  
15 loger les groupes méthyles en position 26 et 27 de EB1089 ou le noyau cyclopropyle de MC 903. Pour les analogues 20-epi-1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> et KH 1060, seuls les conformères de faible énergie, avec une conformation gauche-anti autour de C20, peuvent se loger. Avec une telle géométrie, le groupe méthyle en C21 pointe dans la même cavité comme le ligand naturel, tandis que le reste de la chaîne, du à la combinaison de la conformation anti de C20-C22 et de l'épimérisation de C20, borde le côté opposé de la  
20 cavité de liaison. Cette variation de chemin conduit à différents contacts pour les deux épimères. La distance de la partie 1-hydroxyle jusqu'à la partie 25-hydroxyle est plus courte dans l'analogue 20-epi, de sorte que les chaînes longues, comme dans le cas de KH1060, peuvent loger. Les ligands avec une chaîne aliphatique plus longue adopte une conformation plus compacte et forment des contacts van der Waals additionnels avec la  
25 cavité de liaison qui peut ensuite stabiliser l'hélice en position H12 et/ou affecter des régions moins rigides de la poche de liaison comme la boucle H6-H7.

Ces différents contacts avec une cavité de liaison plutôt rigide peuvent expliquer les différences dans les demi-vies et les activités transcriptionnelles.

La structure de la vitamine D a fait l'objet de nombreuses études ces dix dernières  
30 années. La présente invention fournit pour la première fois une image de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> dans sa conformation active. Jusqu'à maintenant, la chaîne latérale naturelle de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> a été la cible principale des modifications chimiques en vue de découvrir de nouveaux ligands agonistes plus spécifiques.

Le squelette composé des noyaux A à D n'a pas pu être modifié sans perte de la capacité de liaison au ligand. Les analogues auxquels manquent les noyaux entiers C et/ou D mais ayant un espacement normal des groupes hydroxyles peuvent faire des points de contact normaux à l'intérieur de la poche de liaison expliquant leur potentiel biologique normal (Verstuyf et al., 1998).

Le complexe selon l'invention révèle l'arrangement tri-dimensionnel de la poche de liaison autour de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> et fournit de nouvelles perspectives pour la conception de squelettes originaux.

### Bibliographie

Bouillon, R., Okamura, W.H. & Norman, A.W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev.* **16**, 200-257 (1995)

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature* **375**, 377-382 (1995)

Brünger, A.T. *et al.*, Crystallography & NMR System ; a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905-921 (1998)

Brzozowski, A.M. *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758 (1997)

Claire, M. *et al.* Statistical test of models and computerised parameter estimation for aldosterone binding in rat kidney. *FEBS Lett.* **88**, 295-299 (1978)

DeLuca H.F. & Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutr. Rev.* **56**, 54-75 (1998)

Fujishima, T. *et al.* Synthesis and biological activity of 2-methyl-20-epi analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2145-2148 (1998)

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A* **47**, 110-119 (1991)

5 Klaholz, B.P. *et al.* Conformational adaptation of agonists to the human receptor RAR $\gamma$ . *Nature Struct. Biol.* **5**, 199-202 (1998)

Kristjansson, K., Rut, A.R., Hewison, M., O'Riordan, J.L.H. & Hughes, M.R. Two mutations in the hormone binding domain of vitamin D receptor cause tissue resistance  
10 to 1 $\alpha$ , 25 - dihydroxyvitamin D $_3$ . *J. Clin. Invest.* **92**, 12-16 (1993)

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. PROCHECK : a program to check the stereochemical quality of protein structure coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283-291 (1993)

15 Mangelsdorf, D.J. *et al.* The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell* **83**, 835-839 (1995)

20 Nakajima, S., Yamagata, M., Sakai, N. & Ozono, K. Characterization of the activation function-2 domain of the human 1 $\alpha$ , 25 - dihydroxyvitamin D $_3$  receptor. *Mol. Cell. Endocr.* **139**, 15-24 (1998)

Navaza, J. Amore : an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst. A* **50**, 157-163 (1994)

25 Norman *et al.* Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1 $\alpha$ , 25 - dihydroxyvitamin D $_3$  indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans- locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol. Endocr.* **11**, 1518-1531 (1997)

30 Nolte, R.T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Nature* **395**, 137-143 (1998)

Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing X-ray data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 307-326 (1997)

5 Rachez, C. et al. A novel protein complex that interacts with vitamin D3 receptor in a ligand-dependant manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes & Dev.* 12, 1787-1800 (1998)

Renaud, J.P. et al.. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor RAR $\gamma$  complexed with all-trans retinoic acid. *Nature* 378, 681-689 (1995)

10 Suwinska, K. & Kutner, A. Crystal and molecular-structure of 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Acta Cryst. B* 52, 550-554 (1996)

15 Takeyama, K.I. et al. Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1049-1055 (1999)

Verstuyf, A. et al. The biological activity of nonsteroidal vitamin D hormone analogs lacking both the C-rings and D-rings. *J. Bone Miner. Res.* 13, 549-558 (1998)

20 Whitfield, G.K., et al. A highly conserved region in the hormone-binding domain of the human vitamin D receptor contains residues vital for heterodimerization with retinoid X receptor and for transcriptional activation. *Mol. Endocr.* 9, 1166-1179 (1995)

25 Wurtz, J.M. et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct. Biol.* 3, 87-94 (1996)

Xiao, J.H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J.M. & Chambon, P. Cloning expression and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 65, 551-568 (1991)

30

## REVENDICATIONS

1. Polypeptides dérivés du récepteur nucléaire de la vitamine D chez l'homme  
5 ou les différentes espèces du règne animal possédant un tel récepteur, ledit récepteur nucléaire comprenant un domaine de liaison au ligand, ou LBD, ce LBD contenant un domaine d'insertion flexible, lesdits polypeptides dérivés étant caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- les séquences peptidiques desdits récepteurs nucléaires dans lesquelles :

10 \* le domaine d'insertion flexible du LBD est modifié par substitution ou suppression d'au moins environ 30 acides aminés, et de préférence d'au moins environ 40 acides aminés, ou de la totalité des acides aminés composant ce domaine d'insertion,

15 \* et, le cas échéant, un ou plusieurs ou la totalité des acides aminés situés aux positions 1 à environ 125, notamment aux positions 1 à 117 ou 123, des séquences peptidiques desdits VDR, sont modifiés par substitution ou suppression,

lesdits polypeptides dérivés possédant les caractéristiques suivantes :

\* les propriétés de liaison au ligand et de transactivation du LBD du récepteur de la vitamine D sont conservées,

20 \* ils sont stables, à savoir qu'ils peuvent être conservés, notamment dans du NaCl 100 mM à pH 7 pendant au moins environ une semaine, sans que soit pour autant affectées les propriétés susmentionnées du LBD, par opposition au LBD non modifié qui est instable dans les conditions susmentionnées,

25 \* ils sont cristallisables dans des solvants aqueux, notamment à 4°C par la méthode de diffusion de vapeur à goutte suspendue,

\* et, ils sont solubles dans des solvants aqueux,

- ou les séquences peptidiques dérivées des séquences peptidiques définies ci-dessus, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, lesdites séquences dérivées possédant les caractéristiques mentionnées ci-dessus desdits polypeptides dérivés.  
30

2. Polypeptides dérivés selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils comprennent les séquences peptidiques des récepteurs nucléaires de la vitamine D dans lesquelles est supprimé le fragment peptidique délimité :

- d'une part, par un acide aminé situé approximativement à l'une des positions 155 à 175 des séquences peptidiques des récepteurs nucléaires de la vitamine D d'origine humaine ou animale, et plus particulièrement par l'acide aminé situé à l'une des positions 159 à 168 de ces séquences,

- et, d'autre part, par un acide aminé situé approximativement à l'une des positions 204 à 225 des séquences peptidiques des récepteurs nucléaires de la vitamine D d'origine humaine ou animale.

3. Polypeptides dérivés selon la revendication 1 ou 2, lesdits polypeptides dérivés étant choisis parmi ceux comprenant :

- la séquence en acides aminés délimitée par les acides aminés situés aux positions 118 et 427, ou aux positions 124 et 427 des séquences peptidiques des VDR d'origine humaine ou animale, et dans laquelle les résidus situés aux positions 165 à 215 desdites séquences peptidiques des VDR sont supprimés,

- ou une séquence peptidique dérivée de la séquence en acides aminés susmentionnée, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée possédant les caractéristiques mentionnées dans la revendication 1 dudit polypeptide dérivé.

4. Polypeptides dérivés selon l'une des revendications 1 à 3, choisis parmi les polypeptides SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 6, et SEQ ID NO : 8.

5. Cristaux comprenant un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, le cas échéant en association avec la vitamine D, ou un analogue agoniste ou antagoniste de la vitamine D.

6. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4.



7. Séquence nucléotidique selon la revendication 6, choisie parmi :

- les séquences SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 7,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique des séquences nucléotidiques susmentionnées, et codant pour un polypeptide dérivé du hVDR selon la revendication 4,

- ou une séquence nucléotidique dérivée des séquences nucléotidiques susmentionnées, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant pour une séquence peptidique dérivée des polypeptides dérivés du hVDR définis ci-dessus, et possédant les caractéristiques mentionnées selon la revendication 1 desdits polypeptides dérivés.

8. Séquence nucléotidique recombinante comprenant une séquence nucléotidique selon la revendication 6 ou 7 en association avec les éléments nécessaires à la transcription de cette séquence, notamment avec un promoteur et un terminateur de transcription.

9. Vecteur, notamment plasmide, contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 6 à 8.

10. Cellules hôtes transformées par un vecteur selon la revendication 9, lesdites cellules étant choisies notamment parmi les bactéries telles que *E. coli*, ou les cellules d'insectes susceptibles d'être infectées par un baculovirus.

11. Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- transformation de cellules à l'aide d'un vecteur recombinant selon la revendication 9,

- mise en culture des cellules ainsi transformées, et récupération dudit polypeptide produit par lesdites cellules, le cas échéant après purification.

12. Utilisation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, ou de cristaux selon la revendication 5, pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'analogues de la vitamine D.

13. Utilisation selon la revendication 12, pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'analogues agonistes ou antagonistes de la vitamine D susceptibles d'être utilisés dans des compositions pharmaceutiques, notamment dans le cadre du traitement de pathologies cancéreuses, du psoriasis, des maladies auto-immunes, de l'ostéodystrophie ou de l'ostéoporose.

14. Méthode de criblage d'analogues de la vitamine D, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- mise en présence d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, ou de cristaux selon la revendication 5, avantageusement lié à un support solide, avec l'analogue testé, l'un dudit polypeptide ou de l'analogue de la vitamine D étant avantageusement marqué, notamment à l'aide d'un marqueur fluorescent, radioactif ou enzymatique,

- détection de l'éventuelle liaison entre ledit polypeptide, ou lesdits cristaux, et l'analogue testé par mesure du marqueur utilisé, notamment après rinçage du support utilisé lors de l'étape précédente.

15. Utilisation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, ou de cristaux selon la revendication 5, pour la mise en œuvre d'une méthode d'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes formés entre ledit polypeptide, ou lesdits cristaux, et une molécule déterminée.

16. Méthode d'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes formés entre un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, ou de cristaux selon la revendication 5, et une molécule déterminée, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- mise en présence dudit polypeptide dérivé, ou desdits cristaux, avec la molécule déterminée,

- cristallisation du complexe formé entre ledit polypeptide dérivé, ou lesdits cristaux, et la molécule déterminée, notamment par diffusion de vapeur, et analyse tridimensionnelle dudit complexe notamment par remplacement moléculaire,

- ou analyse tridimensionnelle dudit complexe en phase soluble, notamment par RMN.

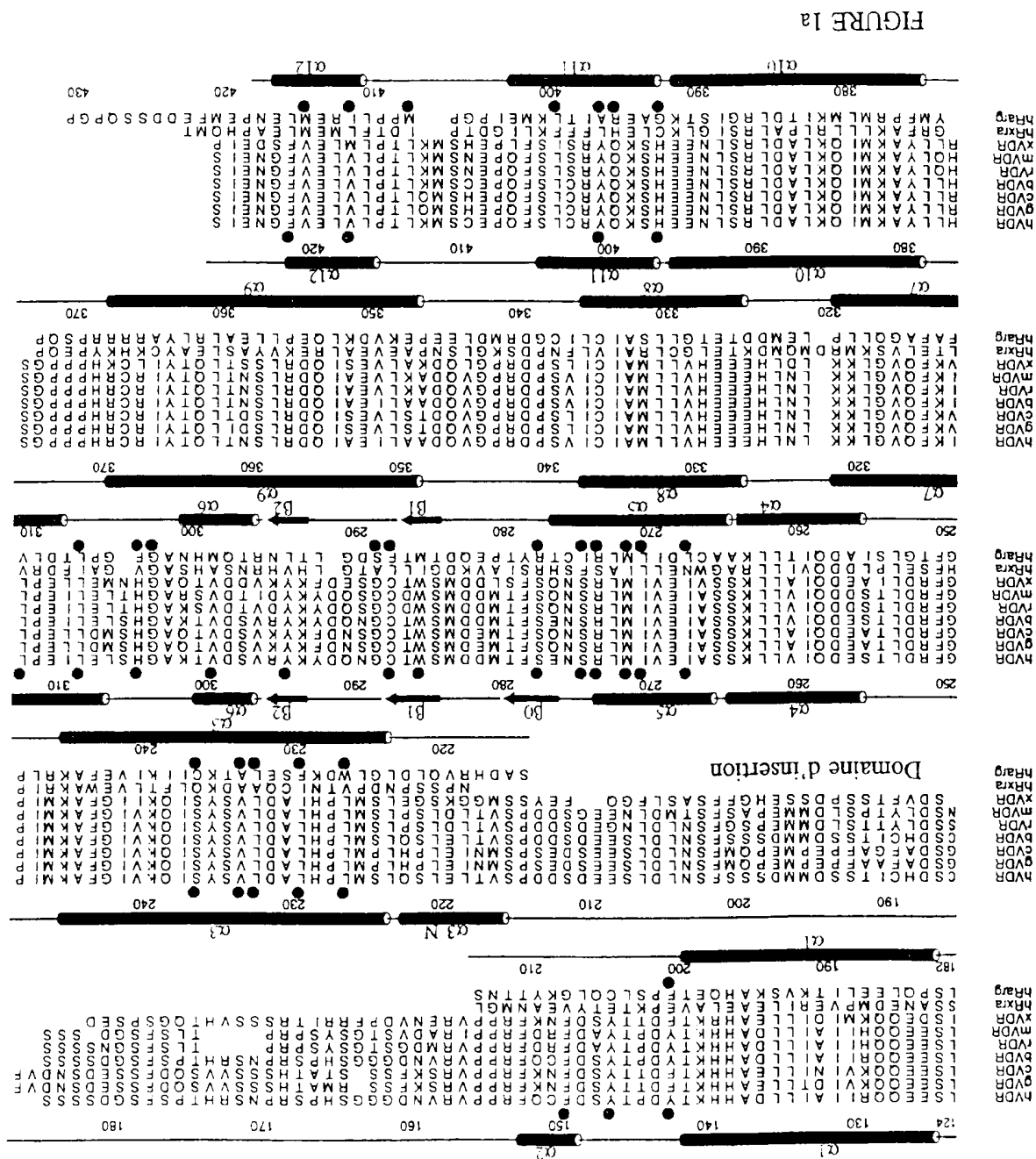


FIGURE 1

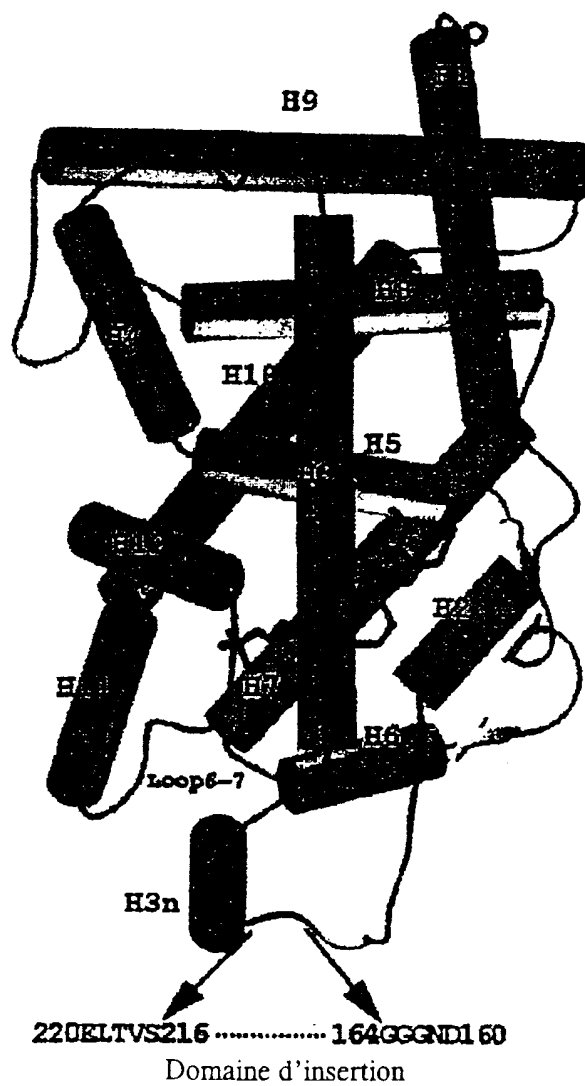


FIGURE 1b

FIGURE 1 (suite)

FIGURE 2a

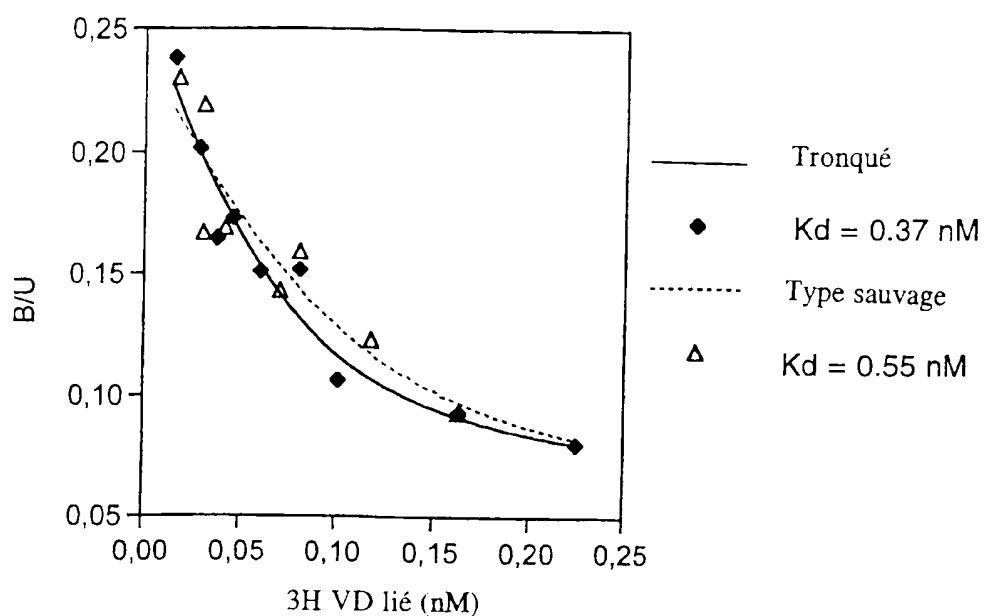


FIGURE 2b

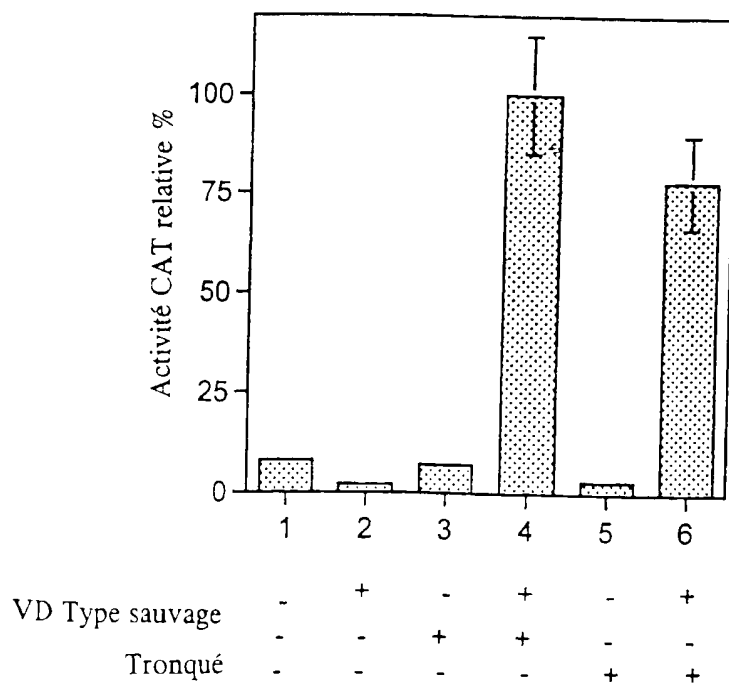


FIGURE 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 3a

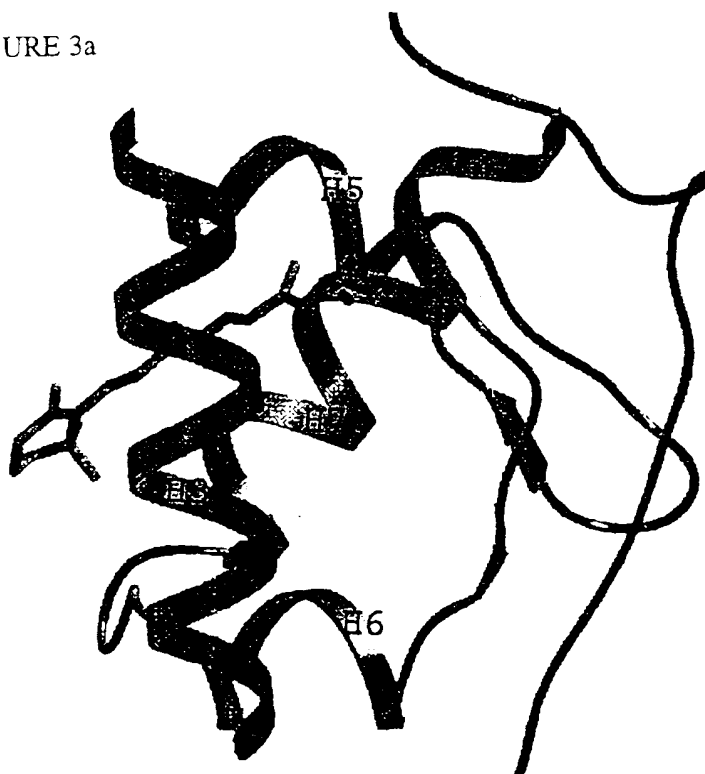


FIGURE 3b

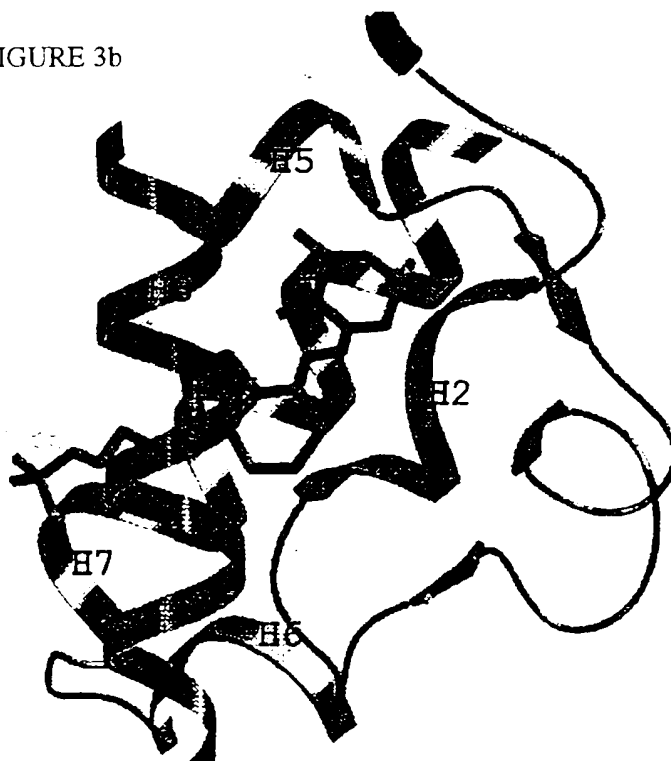


FIGURE 3  
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 3c

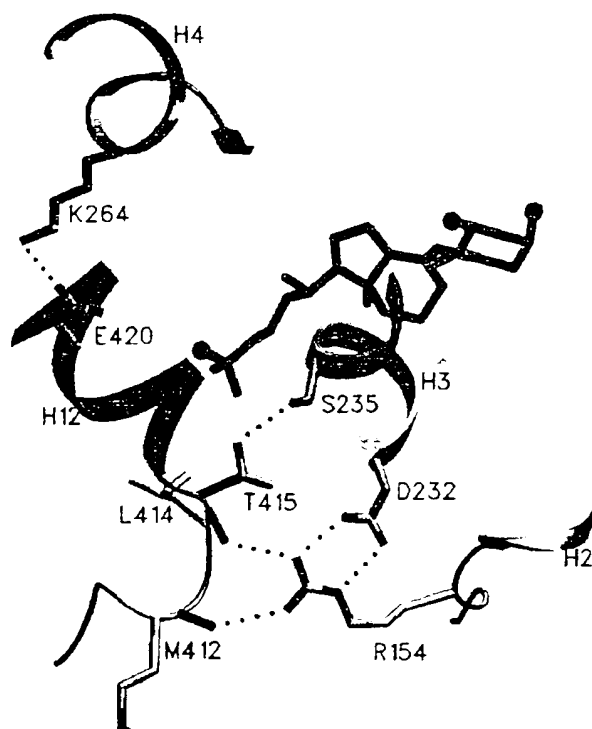


FIGURE 3d

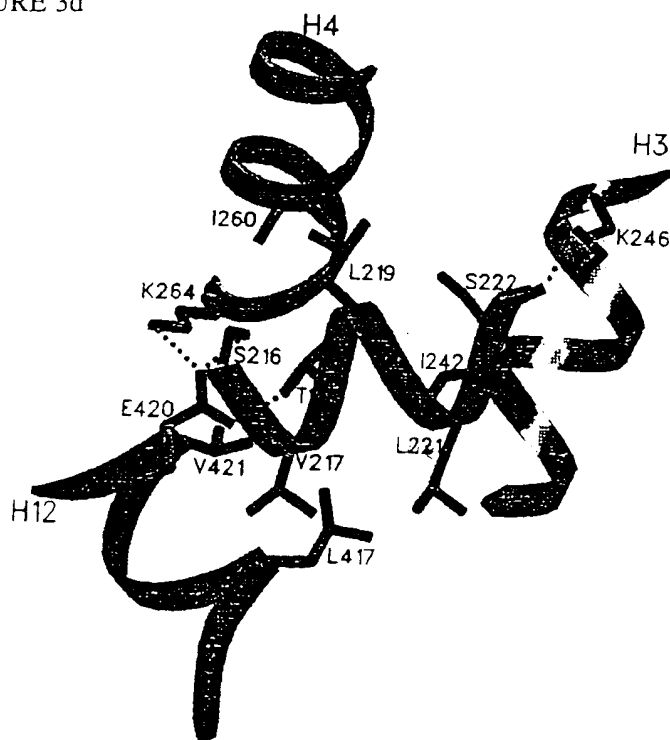




FIGURE 4a

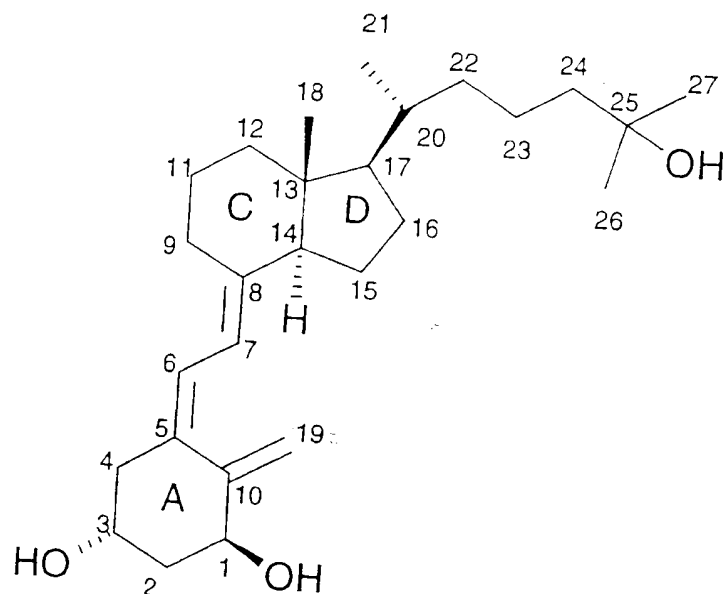


FIGURE 4b

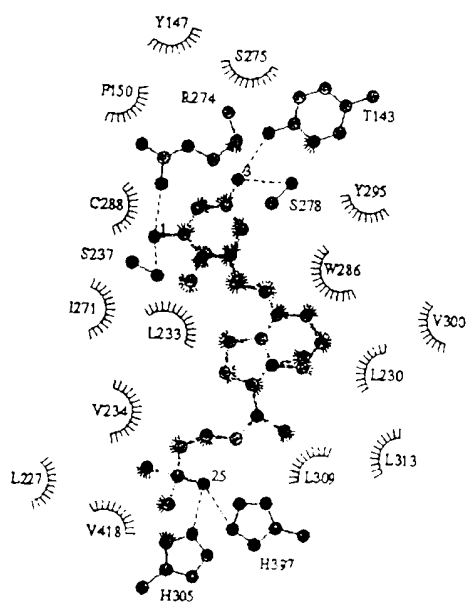


FIGURE 4  
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 4c

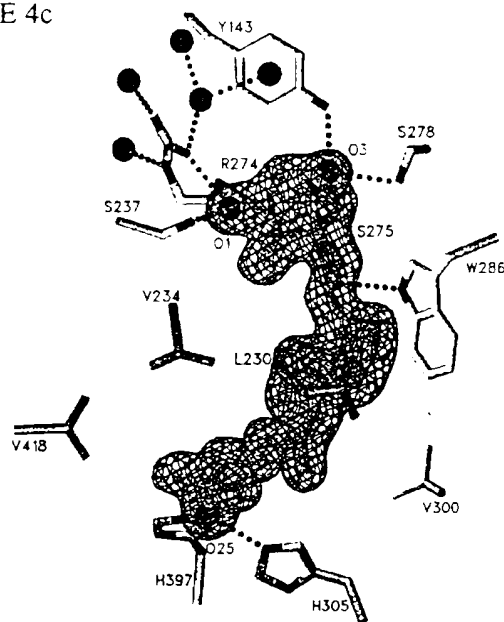


FIGURE 4d

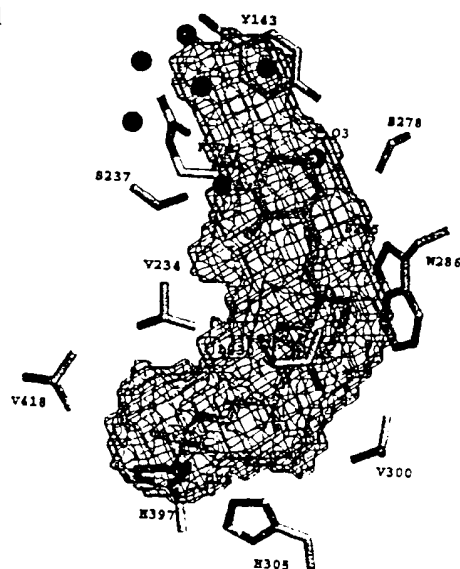


FIGURE 4 (suite)

8/15

atg gag gca atg gag gcc agc act tcc ctg cct gac cct gga gac ttc	48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe	
1 5 10 15	
gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act	96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr	
20 25 30	
ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc	144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe	
35 40 45	
agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg	192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly	
50 55 60	
gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgc cac tgc cag gcc tgc cgg	240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg	
65 70 75 80	
ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg aca	288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr	
85 90 95	
gat gag gaa gtg cag agg aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gaa	336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu	
100 105 110	
gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag	384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln	
115 120 125	
cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac	432
Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp	
130 135 140	
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat	480
Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn	
145 150 155 160	
gat ggt gga ggg agc cat cct tcc agg ccc aac tcc aga cac act ccc	528
Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His Thr Pro	
165 170 175	
agc ttc tct ggg gac tcc tcc tcc tcc tgc tca gat cac tgt atc acc	576
Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser Asp His Cys Ile Thr	
180 185 190	
tct tca gac atg atg gac tgg tcc agc ttc tcc aat ctg gat ctg agt	624
Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Ser Phe Ser Asn Leu Asp Leu Ser	
195 200 205	

Figure 5

9/15

gaa gaa gat tca gat gac cct tct gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc	672
Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu	
210 215 220	
tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag	720
Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys	
225 230 235 240	
gtc att ggc ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc acc tct	768
Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser	
245 250 255	
gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc atc atg	816
Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met	
260 265 270	
ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt	864
Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys	
275 280 285	
ggc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga	912
Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly	
290 295 300	
cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg	960
His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu	
305 310 315 320	
aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc	1008
Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile	
325 330 335	
tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc gcg ctg atc	1056
Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile	
340 345 350	
gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac atc cgc	1104
Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg	
355 360 365	
tgc cgc cac ccg ccc ccg gcc agc cac ctg ctc tat gcc aag atg atc	1152
Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile	
370 375 380	
cag aag cta gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc aag cag	1200
Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln	
385 390 395 400	
tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta acg ccc	1248
Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro	
405 410 415	
ctt gtg ctc gaa gtg ttt gcc aat gag atc tcc tga	1284
Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser	
420 425	

Figure 5 (suite 1)

10/15

atg gag gaa atg gag gaa agc act tcc ctg cct gac cct gga gac ttt	48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe	
1 5 10 15	
gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act	96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr	
20 25 30	
ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc	144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe	
35 40 45	
agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg	192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly	
50 55 60	
gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgc cac tgc cag gcc tgc cgg	240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg	
65 70 75 80	
ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg aca	288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr	
85 90 95	
gat gag gaa gtg cag agg aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gag	336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu	
100 105 110	
gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag	384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln	
115 120 125	
cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac	432
Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp	
130 135 140	
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat	480
Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn	
145 150 155 160	
gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc cag ctg tcc atg ctg	528
Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu	
165 170 175	
ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att ggc	576
Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly	
180 185 190	
ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctg acc tct gag gac cag	624
Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln	
195 200 205	

Figure 6

11/15

atc gta ctg ctg aad tca agt gcc att gag gtc atc atg ttg cgc tcc Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser 210 215 220	672
aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt gcc aac caa Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln 225 230 235 240	720
gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga cac agc ctg Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu 245 250 255	768
gag ctg att gag ccc ctg atc aag ttc cag gtg gga ctg aag aag ctg Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu 260 265 270	816
aac ttg cat gag qag gag cat gtc ctg ctg atg gcc atc tgc atc gtc Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val 275 280 285	864
tcc tca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc qcg ctg atc gag gcc atc Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile 290 295 300	912
cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac atc cgc tgc cgc cac Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His 305 310 315 320	960
ccg ccc ccg ggc agc cac ctg ctg tat gcc aag atg atc cag aag cta Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu 325 330 335	1008
gcc gac ctg cgc agc ctg aat gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys 340 345 350	1056
ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta acg ccc ctt gtg ctg Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu 355 360 365	1104
gaa gtg ttt gcc aat gag atc tcc tga Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser 370 375	1131

Figure 6 (suite 1)

12/15

gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc	48
Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala	
1 5 10 15	
ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac	96
Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp	
20 25 30	
ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat gat ggt gga ggg tct	144
Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser	
35 40 45	
gtg acc cta gag ctg tcc cag ctg tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac	192
Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp	
50 55 60	
ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att ggc ttt gct aag atg ata	240
Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile	
65 70 75 80	
cca gga ttc aga gac ctg acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag	288
Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys	
85 90 95	
tca agt gcc att gag gtc atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc	336
Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr	
100 105 110	
atg gac gac atg tcc tgg acc tgt ggc aac caa gac tac aag tac cgc	384
Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg	
115 120 125	
gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc	432
Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Gln Leu Ile Glu Pro	
130 135 140	
ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag	480
Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu	
145 150 155 160	
gag cat gtc ctg ctg atg gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct	528
Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro	
165 170 175	
ggg gtg cag gac gcc ggc ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc	576
Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser	
180 185 190	
aac aca ctg cag acg tac atc cgc tgc cgc cac cgc ccc ccc gcc agc	624
Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser	
195 200 205	

Figure 7

13/15

cac ctg ctc tat gcc aag atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc	672
His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser	
210 215 220	
ctc aat gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct	720
Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro	
225 230 235 240	
gag tgc agc atg aag cta acg ccc ctt gtg ctc gaa gtg ttt gcc aat	768
Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn	
245 250 255	
gag atc tcc tga	780
Glu Ile Ser	

Figure 7 (suite 1)



14/15

ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac	48
Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His	
1 5 10 15	
cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct	96
His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro	
20 25 30	
cca gtt cgt gtg aat gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc	144
Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser	
35 40 45	
cag ctg tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc	192
Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile	
50 55 60	
caa aag gtc att gcc ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctg	240
Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu	
65 70 75 80	
acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc	288
Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val	
85 90 95	
atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg	336
Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp	
100 105 110	
acc tgt gcc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa	384
Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys	
115 120 125	
gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctg atc aag ttc cag gtg	432
Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val	
130 135 140	
gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctg atg	480
Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met	
145 150 155 160	
gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc gcc	528
Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala	
165 170 175	
ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac	576
Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr	
180 185 190	
atc cgc tgc cgc cac cgg ccc ccg gcc agc cac ctg ctg tat gcc aag	624
Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys	
195 200 205	

Figure 8

15/15

```
atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc 672
Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser
    210                215                220

aag cag tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta 720
Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu
225                230                235                240

acg ccc ctt gtg ctc gaa gtg ttt ggc aat gag atc tcc tga 762
Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser
    245                250
```

Figure 8 (suite 1)

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; CNRS

<120> POLYPEPTIDES DERIVES DU RECEPTEUR NUCLEAIRE DE LA  
VITAMINE D, ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT DANS LE  
CADRE DU CRIBLAGE D'ANALOGUES DE LA VITAMINE D

&lt;130&gt; WEB 99 CNR VID3

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR9914633

&lt;151&gt; 1999-11-22

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1284

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1281)

&lt;400&gt; 1

atg gag gca atg gag gcc agc act tcc ctg cct gac cct gga gac ttt	48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe	
1 5 10 15	

gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act	96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr	
20 25 30	

ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc	144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe	
35 40 45	

agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg	192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly	
50 55 60	

gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgc cac tgc cag gcc tgc cgg	240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg	
65 70 75 80	

ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg aca	288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr	
85 90 95	

gat gag gaa gtg cag aag aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gag	336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu	
100 105 110	

gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag	384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln	
115 120 125	

cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp 130 135 140	432
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn 145 150 155 160	480
gat ggt gga gga ago cat cct tcc agg ccc aac tcc aga cac aat ccc Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His Thr Pro 165 170 175	528
agc ttc tct ggg gac tcc tcc tcc tcc tgc tca gat cac tgt atc acc Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser Asp His Cys Ile Thr 180 185 190	576
tct tca gac atg atg gac tag tcc agc ttc tcc aat ctg gat ctg agt Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Phe Ser Asn Leu Asp Leu Ser 195 200 205	624
gaa gaa gat tca gat gac cct tct gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu 210 215 220	672
tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys 225 230 235 240	720
gtc att gcc att gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc acc tct Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser 245 250 255	768
gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc atc atg Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met 260 265 270	816
ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys 275 280 285	864
ggc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly 290 295 300	912
cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu 305 310 315 320	960
aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile 325 330 335	1008
tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc ggg ctg atc Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile 340 345 350	1056
gag gcc atc cag gcc cgc ctg tcc aac aca ctg cag aag tac atc cgc Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg 355 360 365	1104

tgc cgc cac cgc ccc cgc gcc agc cac ctg ctc tac gcc aag atg atc 1152  
 Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile  
 370 375 380

cag aag cta gcc gac ctg gcc agc ctc aat gag gag cac tcc aag cag 1200  
 Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln  
 385 390 395 400

tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta aag ccc 1248  
 Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro  
 405 410 415

ctt gtc ctc gaa gtc ttt gcc aat gag atc tcc tga 1284  
 Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser  
 420 425

<210> 2

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe  
 1 5 10 15

Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr  
 20 25 30

Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe  
 35 40 45

Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly  
 50 55 60

Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg  
 65 70 75 80

Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr  
 85 90 95

Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu  
 100 105 110

Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln  
 115 120 125

Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp  
 130 135 140

Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn  
 145 150 155 160

Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His Thr Pro  
 165 170 175

Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser Asp His Cys Ile Thr  
 180 185 190

Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Ser Phe Ser Asn Leu Asp Leu Ser  
 195 200 205

Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu  
 210 215 220  
 Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys  
 225 230 235 240  
 Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser  
 245 250 255  
 Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met  
 260 265 270  
 Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys  
 275 280 285  
 Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly  
 290 295 300  
 His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile  
 325 330 335  
 Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile  
 340 345 350  
 Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg  
 355 360 365  
 Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile  
 370 375 380  
 Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln  
 385 390 395 400  
 Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro  
 405 410 415  
 Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser  
 420 425

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1131

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 nucléotidique codant un polypeptide dérivé du  
 récepteur nucléaire de la vitamine D humain

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1128)

&lt;400&gt; 3

atg gag gca atg gag gcc agc aat tcc atg cct gac cct gga gac ttt	48
Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe	
1 5 10 15	
gac cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgt gga gac cga gcc act	96
Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr	
20 25 30	
ggc ttt cac ttc aat gct atg acc tgt gaa ggc tgc aaa ggc ttc ttc	144
Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe	
35 40 45	
agg cga agc atg aag cgg aag gca cta ttc acc tgc ccc ttc aac ggg	192
Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly	
50 55 60	
gac tgc cgc atc acc aag gac aac cga cgg cac tgc cag gcc tgc cgg	240
Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg	
65 70 75 80	
ctc aaa cgc tgt gtg gac atc ggc atg atg aag gag ttc att ctg acc	288
Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr	
85 90 95	
gat gag gaa gtg cag agg aag cgg gag atg atc ctg aag cgg aag gag	336
Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu	
100 105 110	
gag gag gcc ttg aag gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag	384
Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln	
115 120 125	
cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac	432
Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp	
130 135 140	
ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat	480
Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn	
145 150 155 160	
gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc cag ctg tcc atg ctg	528
Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu	
165 170 175	
ccc cac ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att gcc	576
Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly	
180 185 190	
ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctg acc tct gag gac caa	624
Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln	
195 200 205	
atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc atc atc ttg cgc tcc	672
Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser	
210 215 220	
aat gag tcc ttc acc atg gac gac atg tcc tgg acc tgt ggc aac caa	720
Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln	
225 230 235 240	

gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa ggc gga cac agc ctg 768  
 Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu  
 245 250 255  
 gag ctg att gag ccc ctg atc aag ttc cag gtg gga ctg aag aag ctg 816  
 Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu  
 260 265 270  
 aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctg atg gcc atc tgc atc gtc 864  
 Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val  
 275 280 285  
 tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc ggc ctg atc gag gcc atc 912  
 Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile  
 290 295 300  
 cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac atc cgc tgc cgc cac 960  
 Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His  
 305 310 315 320  
 ccg cbc ccg ggc agc cac ctg ctg tat gcc aag atg atc cag aag cta 1008  
 Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu  
 325 330 335  
 gcc gac ctg cgc agc ctg aat gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc 1056  
 Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys  
 340 345 350  
 ctg tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta aag ccc ctt gtg ctg 1104  
 Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu  
 355 360 365  
 gaa gtg ttt gcc aat gag atc tcc tga 1131  
 Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser  
 370 375

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 376

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 nucléotidique codant un polypeptide dérivé du  
 récepteur nucléaire de la vitamine D humain

&lt;400&gt; 4

Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe  
 1 5 10 15

Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr  
 20 25 30

Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe  
 35 40 45

Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe Asn Gly  
 50 55 60

Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala Cys Arg  
 65 70 75 80



Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile Leu Thr  
                     85                    90                    95  
 Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg Lys Glu  
                     100                    105                    110  
 Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln  
                     115                    120                    125  
 Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp  
                     130                    135                    140  
 Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn  
 145                    150                    155                    160  
 Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu  
                     165                    170                    175  
 Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly  
                     180                    185                    190  
 Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln  
                     195                    200                    205  
 Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser  
                     210                    215                    220  
 Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln  
 225                    230                    235                    240  
 Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu  
                     245                    250                    255  
 Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu  
                     260                    265                    270  
 Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val  
                     275                    280                    285  
 Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile  
                     290                    295                    300  
 Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His  
 305                    310                    315                    320  
 Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu  
                     325                    330                    335  
 Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys  
                     340                    345                    350  
 Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu  
                     355                    360                    365  
 Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser  
                     370                    375

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 780

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
nucléotidique codant un polypeptide dérivé du  
récepteur nucléaire de la vitamine D humain

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(777)

&lt;400&gt; 5

gac agt ctg cgg ccc aag ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc	48
Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala	
1 5 10 15	
ata ctg ctg gac gcc cac cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac	96
Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp	
20 25 30	
ttc tgc cag ttc cgg cct cca gtt cgt gtg aat gat ggt gca ggg tct	144
Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser	
35 40 45	
gtg acc cta gag ctg tcc cag ctc tcc atg ctg ccc cac ctg gct gac	192
Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp	
50 55 60	
ctg gtc agt tac agc atc caa aag gtc att gcc ttt gct aag atg ata	240
Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile	
65 70 75 80	
cca gga ttc aga gac ctc acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag	288
Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys	
85 90 95	
tca agt gcc att gag gtc atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc	336
Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr	
100 105 110	
atg gac gac atg tcc tgg acc tgt ggc aac caa gac tac aag tac cgc	384
Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg	
115 120 125	
gtc agt gac gtg acc aaa gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc	432
Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro	
130 135 140	
ctc atc aag ttc cag gtg gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag	480
Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu	
145 150 155 160	
gag cat gtc ctg ctc atg gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct	528
Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro	
165 170 175	
ggg gtg cag gac gcc gcg ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc	576
Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser	
180 185 190	

aac aca atg cag acg tac atc cgc tgc cgc cac ccg ccc ccg ggc agc 624  
 Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser  
 195 200 205  
 cac ctg ctg tat gcc aag atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc 672  
 His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser  
 210 215 220  
 ctg aat gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc ctg tcc ttc cag cct 720  
 Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro  
 225 230 235 240  
 gag tgc agc atg aag cta acg ccc ctt gtg cta gaa gtg ttt ggc aat 768  
 Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn  
 245 250 255  
 gag atc tcc tga 780  
 Glu Ile Ser

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 259

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 nucléotidique codant un polypeptide dérivé du  
 récepteur nucléaire de la vitamine D humain

&lt;400&gt; 6

Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala  
 1 5 10 15

Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp  
 20 25 30

Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser  
 35 40 45

Val Thr Leu Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp  
 50 55 60

Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile  
 65 70 75 80

Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys  
 85 90 95

Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr  
 100 105 110

Met Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg  
 115 120 125

Val Ser Asp Val Thr Lys Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro  
 130 135 140

Leu Ile Lys Phe Gln Val Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu  
 145 150 155 160

Glu His Val Leu Leu Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro  
 165 170 175

Gly Val Gln Asp Ala Ala Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser  
180 195 190

Asn Thr Leu Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser  
195 200 205

His Leu Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser  
210 215 220

Leu Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro  
225 230 235 240

Glu Cys Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn  
245 250 255

Glu Ile Ser

<210> 7

<211> 762

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
nucléotidique codant un polypeptide ndérivé du  
récepteur de la vitamine D humain

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(759)

<400> 7

ctg tct gag gag cag cag cgc atc att gcc ata ctg ctg gac gcc cac 48  
Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His  
1 5 10 15

cat aag acc tac gac ccc acc tac tcc gac ttc tgc cag ttc cgg cct 96  
His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro  
20 25 30

cca gtt cgt gtg aat gat ggt gga ggg agc gtg acc cta gag ctg tcc 144  
Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser  
35 40 45

cag ctc tcc atg ctg ccc ccc ctg gct gac ctg gtc agt tac agc atc 192  
Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile  
50 55 60

caa aag gtc att ggc ttt gct aag atg ata cca gga ttc aga gac ctc 240  
Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu  
65 70 75 80

acc tct gag gac cag atc gta ctg ctg aag tca agt gcc att gag gtc 288  
Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val  
85 90 95

atc atg ttg cgc tcc aat gag tcc ttc acc atg gag gac atg tcc tgg 335  
 Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp  
 100 105 110  
 acc tgt ggc aac caa gac tac aag tac cgc gtc agt gac gtg acc aaa 334  
 Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys  
 115 120 125  
 gcc gga cac agc ctg gag ctg att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg 432  
 Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val  
 130 135 140  
 gga ctg aag aag ctg aac ttg cat gag gag gag cat gtc ctg ctc atg 480  
 Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met  
 145 150 155 160  
 gcc atc tgc atc gtc tcc cca gat cgt cct ggg gtg cag gac gcc ggc 528  
 Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala  
 165 170 175  
 ctg atc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac aca ctg cag acg tac 576  
 Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr  
 180 185 190  
 atc cgc tgc cgc cac ccg ccc ccg ggc agc cac ctg ctc tat gcc aag 624  
 Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys  
 195 200 205  
 atg atc cag aag cta gcc gac ctg cgc agc ctc aat gag gag cac tcc 672  
 Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser  
 210 215 220  
 aag cag tac cgc tgc ctc tcc ttc cag cct gag tgc agc atg aag cta 720  
 Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu  
 225 230 235 240  
 acg ccc ctt gtg ctc gaa gtg ttt ggc aat gag atc tcc tga 762  
 Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser  
 245 250

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 253

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: séquence  
 nucléotidique codant un polypeptide ndérivé du  
 récepteur de la vitamine D humain

&lt;400&gt; 8

Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His  
 1 5 10 15

His Lys Thr Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro  
 20 25 30

Pro Val Arg Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser  
 35 40 45

Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile  
 50 55 60

Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu  
65 70 75 80

Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val  
85 90 95

Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp  
100 105 110

Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys  
115 120 125

Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val  
130 135 140

Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met  
145 150 155 160

Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala  
165 170 175

Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr  
180 185 190

Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys  
195 200 205

Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser  
210 215 220

Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu  
225 230 235 240

Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser  
245 250

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/FR 00/03248

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/705 C12N15/10 C12N15/12 C12N15/63 G01N33/53  
 A61K38/17 A61P33/14 A61P35/00 A61P3/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WURTZ J -M ET AL: "A CANONICAL STRUCTURE FOR THE LIGAND-BINDING DOMAIN OF NUCLEAR RECEPTORS" NATURAL STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 3, 1996, pages 87-94, XP000610199 cited in the application page 88, right-hand column, paragraph 2 -page 93, left-hand column, paragraph 1 ---	1,11-15
Y	RENAUD JEAN-PAUL ET AL: "Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid." NATURE (LONDON), vol. 378, no. 6558, 1995, pages 681-689, XP000885365 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---	1,11-15
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 2001

Date of mailing of the international search report

19/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
 Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03248

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	BAKER A R ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF FULL-LENGTH COMPLEMENTARY DNA ENCODING HUMAN VITAMIN D RECEPTOR" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 85, no. 10, 1988, pages 3294-3298, XP000982874 1988 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	4,7
X	GOTO H ET AL: "A SINGLE RECEPTOR IDENTICAL WITH THAT FROM INTESTINE-T47D CELLS MEDIATES THE ACTION OF 1 25 DIHYDROXYVITAMIN D-3 IN HL-60 CELLS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1132, no. 1, 1992, pages 103-108, XP000991535 ISSN: 0006-3002 the whole document ---	4,7
A	WO 98 31835 A (UNIV MARYLAND ;HAGBERG JAMES M (US); UNIV PITTSBURGH (US); FERRELL) 23 July 1998 (1998-07-23) SEQ.ID.N.15 page 3, line 4-9 page 20, line 26 -page 21, line 7 ---	4
A	BRZOZOWSKI A ET AL: "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor" NATURE,GB,MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, no. 389, 16 October 1997 (1997-10-16), pages 753-758, XP002075907 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---	1,11,13
A	HAUSSLER M R ET AL: "THE VITAMIN D HORMONE AND ITS NUCLEAR RECEPTOR: MOLECULAR ACTIONS AND DISEASE STATES" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY,GB,BRISTOL, vol. 154, no. 154, September 1997 (1997-09), pages S57-S73-S73, XP000867746 ISSN: 0022-0795 the whole document --- -/--	1,11-15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03248

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No
A	POULJOL N ET AL: "3D model of the androgen receptor (AR) ligand-binding (LBD): Validation by artificial and naturally occurring mutations of the androgen receptor gene." HORMONE RESEARCH (BASEL), vol. 50, no. SUPPL. 3, 1998, page 7 XP000933935 37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology; Florence, Italy; September 24-27, 1998 ISSN: 0301-0163 abstract	1,11-15
A	WO 99 19354 A (BERKENSTAM ANDERS ; PHARMACIA & UPJOHN AB (SE); DAHLBERG MATS (SE)) 22 April 1999 (1999-04-22) page 3, line 15 -page 12, line 10	1-4,6-12
A	WO 99 50658 A (GREENE GEOFFREY L ; AGARD DAVID A (US); ARCH DEV CORP (US); KUSHNER) 7 October 1999 (1999-10-07) abstract page 5, line 13 -page 7, line 10; examples	1,11-15
A	DATABASE WPI Section Ch. Week 199907 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1999-080898 XP002146587 & WO 98 56908 A (CHUGAI SEIYAKU KK), 17 December 1998 (1998-12-17) abstract	1-4,6-12
A	WO 99 16872 A (CROFTS LINDA ANNE ; GARVAN INST MED RES (AU); EISMAN JOHN A (AU); H) 8 April 1999 (1999-04-08) abstract page 2, line 19 -page 6, line 20; figure 6	1-4,6-12
A	MANGELSDORF DAVID J ET AL: "The nuclear receptor superfamily: The second decade." CELL, vol. 83, no. 6, 15 December 1995 (1995-12-15), pages 835-839, XP000929729 ISSN: 0092-8674 cited in the application the whole document	1

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/03248

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P, X	<p>ROCHEL N ET AL: "The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand."  MOLECULAR CELL.,  vol. 5, no. 1, January 2000 (2000-01),  pages 173-179, XP000929728  ISSN: 1097-2765  the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9831835 A	23-07-1998	AU 6012798 A EP 0966543 A	07-08-1998 29-12-1999
WO 9919354 A	22-04-1999	AU 9013198 A CN 1279689 T EP 1023323 A	03-05-1999 10-01-2001 02-08-2000
WO 9950658 A	07-10-1999	AU 3457199 A AU 5769099 A EP 1068529 A WO 9960014 A	18-10-1999 06-12-1999 17-01-2001 25-11-1999
WO 9856908 A	17-12-1998	AU 3107097 A	30-12-1998
WO 9916872 A	08-04-1999	AU 9331198 A EP 1019504 A	23-04-1999 19-07-2000

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 00/03248

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K14/705 C12N15/10 C12N15/12 C12N15/63 G01N33/53  
A61K38/17 A61P33/14 A61P35/00 A61P3/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WURTZ J -M ET AL: "A CANONICAL STRUCTURE FOR THE LIGAND-BINDING DOMAIN OF NUCLEAR RECEPTORS" NATURAL STRUCTURAL BIOLOGY, vol. 3, 1996, pages 87-94. XP000610199 cité dans la demande page 88, colonne de droite, alinéa 2 -page 93, colonne de gauche, alinéa 1	1,11-15
Y	RENAUD JEAN-PAUL ET AL: "Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid." NATURE (LONDON), vol. 378, no. 6558, 1995, pages 681-689, XP000885365 ISSN: 0028-0836 cité dans la demande le document en entier	1,11-15



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités

- \*A\* document définissant l'état général de la technique non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 mars 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19/03/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets - P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040. Tx: 31 651 eponi  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/03248

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BAKER A R ET AL: "CLONING AND EXPRESSION OF FULL-LENGTH COMPLEMENTARY DNA ENCODING HUMAN VITAMIN D RECEPTOR" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 85, no. 10, 1988, pages 3294-3298, XP000982874 1988 ISSN: 0027-8424 le document en entier ---</p>	4,7
X	<p>GOTO H ET AL: "A SINGLE RECEPTOR IDENTICAL WITH THAT FROM INTESTINE-T47D CELLS MEDIATES THE ACTION OF 1 25 DIHYDROXYVITAMIN D-3 IN HL-60 CELLS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1132, no. 1, 1992, pages 103-108, XP000991535 ISSN: 0006-3002 le document en entier ---</p>	4,7
A	<p>WO 98 31835 A (UNIV MARYLAND ;HAGBERG JAMES M (US); UNIV PITTSBURGH (US); FERRELL) 23 juillet 1998 (1998-07-23) SEQ.ID.N.15 page 3, ligne 4-9 page 20, ligne 26 -page 21, ligne 7 ---</p>	4
A	<p>BRZOZOWSKI A ET AL: "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor" NATURE,GB,MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, no. 389, 16 octobre 1997 (1997-10-16), pages 753-758, XP002075907 ISSN: 0028-0836 cité dans la demande le document en entier ---</p>	1,11,13
A	<p>HAUSSLER M R ET AL: "THE VITAMIN D HORMONE AND ITS NUCLEAR RECEPTOR: MOLECULAR ACTIONS AND DISEASE STATES" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY,GB,BRISTOL, vol. 154, no. 154, septembre 1997 (1997-09), pages S57-S73-S73, XP000867746 ISSN: 0022-0795 le document en entier ---</p>	1,11-15

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 00/03248

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
A	<p>POULJOL N ET AL: "3D model of the androgen receptor (AR) ligand-binding (LBD): Validation by artificial and naturally occurring mutations of the androgen receptor gene." HORMONE RESEARCH (BASEL), vol. 50, no. SUPPL. 3, 1998, page 7 XP000933935</p> <p>37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology; Florence, Italy; 24-27 Septembre 1998 ISSN: 0301-0163 abrégé</p> <p>----</p>	1,11-15
A	<p>WO 99 19354 A (BERKENSTAM ANDERS ; PHARMACIA &amp; UPJOHN AB (SE); DAHLBERG MATS (SE)) 22 avril 1999 (1999-04-22) page 3, ligne 15 -page 12, ligne 10</p> <p>----</p>	1-4,6-12
A	<p>WO 99 50658 A (GREENE GEOFFREY L ; AGARD DAVID A (US); ARCH DEV CORP (US); KUSHNER) 7 octobre 1999 (1999-10-07) abrégé page 5, ligne 13 -page 7, ligne 10; exemples</p> <p>----</p>	1,11-15
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199907 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1999-080898 XP002146587 &amp; WO 98 56908 A (CHUGAI SEIYAKU KK), 17 décembre 1998 (1998-12-17) abrégé</p> <p>----</p>	1-4,6-12
A	<p>WO 99 16872 A (CROFTS LINDA ANNE ; GARVAN INST MED RES (AU); EISMAN JOHN A (AU); H) 8 avril 1999 (1999-04-08) abrégé page 2, ligne 19 -page 6, ligne 20; figure 6</p> <p>----</p>	1-4,6-12
A	<p>MANGELSDORF DAVID J ET AL: "The nuclear receptor superfamily: The second decade." CELL, vol. 83, no. 6, 15 décembre 1995 (1995-12-15). pages 835-839, XP000929729 ISSN: 0092-8674 cité dans la demande le document en entier</p> <p>----</p>	1
	-/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 00/03248

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
P,X	<p>ROCHEL N ET AL: "The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand."  MOLECULAR CELL.,  vol. 5, no. 1, janvier 2000 (2000-01),  pages 173-179, XP000929728  ISSN: 1097-2765  le document en entier  -----</p>	1-15

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demar internationale No

PCT/FR 00/03248

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9831835 A	23-07-1998	AU 6012798 A EP 0966543 A	07-08-1998 29-12-1999
WO 9919354 A	22-04-1999	AU 9013198 A CN 1279689 T EP 1023323 A	03-05-1999 10-01-2001 02-08-2000
WO 9950658 A	07-10-1999	AU 3457199 A AU 5769099 A EP 1068529 A WO 9960014 A	18-10-1999 06-12-1999 17-01-2001 25-11-1999
WO 9856908 A	17-12-1998	AU 3107097 A	30-12-1998
WO 9916872 A	08-04-1999	AU 9331198 A EP 1019504 A	23-04-1999 19-07-2000